Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Remmer

Inaktivierung mikrosomaler Reduktasen durch lysosomale Enzyme

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Heinrich Betz
aus Reutlingen

1971

Aus dem Toxikologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Remmer

Inaktivierung mikrosomaler Reduktasen durch lysosomale Enzyme

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Heinrich Betz
aus Reutlingen

1971

Dekan: Prof. Dr. H. J. Knüttgen
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Remmer
2. Berichterstatter: Privdoz. Dr. L. Flohé

FOTOSCHNELLDRUCK R. Köhler - Tübingen - vorm. Frau Elly Huth

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Zusammenfassung	Seite 2
Einleitung	Seite 3
Methoden	Seite 4
Lysosomenisolierung	Seite 4
Mikrosomenisolierung	Seite 4
Trennung glatter und rauher Mikrosomenfraktionen	Seite 5
Enzymbestimmungen	Seite 5
Protein- und Aminosäure-bestimmung	Seite 7
Inaktivierungsansätze	Seite 7
Solubilisierungsversuche	Seite 8
Ergebnisse	Seite 8
Eigenschaften der verwendeten Fraktionen	Seite 8
Inaktivierungsversuche	Seite 12
Aminosäurefreisetzung in den Inkubationsansätzen	Seite 15
Solubilisierungsversuche	Seite 17
Diskussion	Seite 19
Literaturverzeichnis	Seite 23
Lebenslauf	Seite 27

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0078

Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde die Inaktivierung mikrosomaler Reduktasen durch lysosomale Enzyme bei p_H 5,0 und p_H 7,0 untersucht. Die Lysosomenpräparation wurde durch Messung verschiedener Markerenzyme charakterisiert. Bei p_H 5,0 fand sich eine spezifische Wirkung der lysosomalen Enzyme auf die Inaktivierung der NADH-Cytochrom c-Reduktase, keinerlei Wirkung jedoch auf die der NADPH-Cytochrom c-Reduktase bei gleichzeitiger effizienter Proteolyse, während bei p_H 7,0 weder eine wesentliche Beschleunigung der Inaktivierung der untersuchten Reduktasen noch eine Aminosäurefreisetzung erfolgte. Beim Vergleich der Befunde mit denen anderer Arbeitsgruppen ergab sich, daß eine direkte Steuerung der verschiedenen Umsatzraten der einzelnen mikrosomalen Proteine durch die Lysosomen recht unwahrscheinlich ist.

Einleitung

So viel Erkenntnisse in den letzten Jahren über Mechanismus und Regulation der Proteinbiosynthese gewonnen wurden, so dunkel bleibt immer noch, wie in der Zelle der Abbau der einzelnen Zellbestandteile, die ja zum Teil recht unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen (vgl. Übersichtsartikel 5,20), bewerkstelligt wird. Bisher wissen wir nur, daß Lysosomen, Hydrolasen-haltige Zellpartikel, außer durch Endocytose aufgenommenem exogenen Material auch Zellorganellenbruchstücke enthalten können (vgl. Übersichtsartikel 7,8), und daß die lysosomalen Enzyme in vitro - allerdings nur bei saurem p_H - durchaus die erforderliche hydrolytische Kapazität zum Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren, Polysacchariden und Lipiden auch extrazellulärer Herkunft besitzen (1,6,10). Recht unklar bleibt jedoch, wie der verschiedene Turnover einzelner Proteine innerhalb eines Membransystems wie zum Beispiel dem endoplasmatischen Retikulum vor sich gehen soll. (4,12, 14,18,20). Immerhin konnten lösliche neutrale Proteasen im Cytoplasma nachgewiesen werden (5,6), die am Abbau einzelner Proteine beteiligt sein könnten. Andererseits bestünde auch die Möglichkeit, daß Lysosomen dadurch eine gewisse Fähigkeit zur Selektion besitzen, daß die Abbaugeschwindigkeit einzelner Proteine durch das Lysosom stark unterschiedlich ist. Zur Überprüfung der letzteren Hypothese versuchte ich in vorliegender Arbeit festzustellen, ob und inwieweit lysosomale Enzyme die Inaktivierung zweier mikrosomaler Proteine - der NADH-Cytochrom c-Reduktase und der NADPH-Cytochrom c-Reduktase - beeinflussen, wobei ich von der Voraussetzung ausging, daß die Inaktivierung eines Proteins im allgemeinen der Hydrolyse desselben vorausgeht und damit einen brauchbaren Parameter für den Beginn des lysosomalen Abbaus darstellt, was durch Er-

gebnisse anderer Arbeitsgruppen wahrscheinlich erscheint (6). Die Inaktivierung wurde mit der Aminosäurefreisetzung als Maß für die tatsächlich erfolgte Proteolyse und mit der Ablösung der Enzyme von der mikrosomalen Membran verglichen.

Methoden

Als Versuchstiere wurden weibliche, mit Altromin M 6 Mischfutter ernährte Wistarratten (160 - 180 gr) verwendet. Zur Verringerung des Leberglykogens hungerten die Tiere die letzten 12 Std vor dem Tode.
Lysosomen isolierte ich aus Tieren, die mit Triton WR 1339 vorbehandelt waren (85 mg pro 100 gr Körpergewicht intraperitoneal 3,5 Tage vor dem Tode, 15).
Die Lebern wurden mit der 6fachen Gewichtsmenge 0,25 M Sucrose homogenisiert. Durch 10minütige Zentrifugation bei 2 400 g wurden Zelldebris und Kerne abgetrennt, Sedimentation bei 16 000 g über 20 Min lieferte eine mitochondrien- und lysosomenreiche Fraktion (M + L - Fraktion nach Leighton et al., 15). Diese Fraktion wurde zur Flotation nach Trouet (vgl. 15) in 45%iger Sucrose unter einen diskontinuierlichen Gradienten aus 34,5%iger Sucrose und 14,3%iger Sucrose geschichtet. Nach zweistündiger Zentrifugation bei 35 000 Upm im SW 25 Rotor hatten sich die Lysosomen an der Grenze zwischen den beiden oberen Schichten angesammelt, während Mitochondrien und Peroxisomen in der unteren Phase verblieben. Die vereinigten Lysosomenfraktionen wurden mit 0,25 M Sucrose auf die Hälfte verdünnt und 20 Min mit 100 000 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,1 M Citratpuffer p_H 6,0 resuspendiert und tiefgefroren aufbewahrt. Für die Inkubationsversuche schloß ich die Lysosomen zur Freisetzung der enthaltenen Enzyme durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen auf.
Zur Mikrosomenisolierung nach Schenkmann et al. (19)

wurden die Lebern mit der 6fachen Gewichtsmenge einer Pufferlösung (1 Teil 0,25 M Tris/HCl-Puffer p_H 7,5 ad 4 Teile 1,15% KCl) homogenisiert und 9 Min bei 500 g, anschließend 1 Min bei 3 000 g zentrifugiert. Weitere Zentrifugation für jeweils 10 Min bei 7 000 g und 12 500 g lieferte den postmitochondrialen Überstand, aus dem ich nach 1 Std bei 100 000 g Mikrosomen in Form eines roten Sediments isolieren konnte. Die Mikrosomen wurden einmal mit oben genannter Pufferlösung gewaschen und 1 Std bei 100 000 g abzentrifugiert, bei 0 - 3° C aufbewahrt und innerhalb von höchstens 6 Std verwendet.

Zur Trennung glatter und rauher Mikrosomenfraktionen nach Fouts (9) erfolgte durch Unterschichtung dreier Teile des postmitochondrialen Überstandes mit einem Teil 1,13 M Sucroselösung und anschließende 8stündige Zentrifugation bei 105 000 g. Danach hatte sich die glatte Mikrosomenfraktion in der Sucroselösung über einem festen Bodensatz aus rauhen Mikrosomen angesammelt. Die Schichten wurden getrennt aus dem Zentrifugenrohr abgepumpt, die obere Phase entsprach dem Cytosol mit den darin enthaltenen neutralen Proteasen, die untere Phase mit den glatten Mikrosomen wurde mit 0,25 M Tris/HCl-Puffer p_H 7,0 auf das 4fache verdünnt und 1 Std bei 150 000 g zentrifugiert.

Die Aufarbeitung meiner Lysosomenfraktionen verfolgte ich durch Bestimmung folgender Enzymaktivitäten:

Succinatdehydrogenase (EC 1.3.99.1): Dieses mitochondriale Markerenzym bestimmte ich mit Cytochrom c als Elektronenakzeptor in Anwesenheit von Phenazinmethosulfat nach Arrigoni und Singer (2).

Glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9): Zur Abschätzung des mikrosomalen Anteils in den Fraktionen maß ich die Phosphatfreisetzung aus Glucose-6-phosphat nach Leighton et al. (15). Die so gemessenen Glucose-6-phosphatase-

Aktivitäten setzen sich aus der spezifischen Wirkung der Glucose-6-phosphatase und der unspezifischen der sauren Phosphatase auf die Hydrolyse des Glucose-6-phosphats zusammen. Dadurch erhält man in lysosomenreichen, d.h. saure- Phosphatase-reichen Präparationen zu hohe Werte für die Glucose-6-phosphatase-Aktivität (15).

Katalase (EC 1.11.1.6): Die Verteilung der Peroxisomen zeigte mir die H_2O_2-Zersetzung durch dieses Enzym, gemessen nach Bergmeyer (3).

β-Glucuronidase (EC 3.2.1.31): Dieses Enzym wurde durch Hydrolyse des synthetischen Substrates Na-Phenolphtalein-Glucuronid nach Gianetto und De Duve (11) bestimmt.

Saure Phosphatase (EC 3.1.3.2): Das aus Na-β-Glycerophosphat freigesetzte anorganische Phosphat ergab die Aktivität dieses lysosomalen Leitenzyms nach Leighton et al. (15).

Anorganisches Phosphat bestimmte ich nach Fiske und Subarow (16).

In den unten beschriebenen Inaktivierungsansätzen verfolgte ich die Abnahme folgender mikrosomaler Reduktase-Aktivitäten: NADH-Cytochrom c-Reduktase (EC 1.6.99.3): nach Strittmatter et al. (22).

Testansatz: 0,5 ml Phosphatpuffer 0,1 M, p_H 7,6
0,2 ml NADH (500 mμM in obigem Puffer)
0,2 ml Cytochrom c (170 mμM in obigem Puffer)
0,1 ml Enzymlösung

Die Aktivität wurde durch Änderung der Absorption bei 550 mμ gegen einen gleichartigen Blindwert ohne NADH gemessen.

Millimolare Extinktionsdifferenz (cm^{-1} mM^{-1}) zwischen reduziertem und oxidiertem Cytochrom c bei 550 mμ: 21.1 (23).

NADPH-Cytochrom c-Reduktase (EC 1.6.2.3): nach Williams et al. (24).

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte ebenso wie bei der NADH-Cytochrom c-Reduktase. Als Coenzym wurde NADPH verwendet (500 mμM in 0,1 M Phosphatpuffer p_H 7,6).

Alle enzymatischen Bestimmungen wurden im Leitz Unicam SP 800 Differenzspektrophotometer mit Zusatzschreiber Servogor durchgeführt. Die spezifischen Einheiten wurden in U (μMol umgesetztes Substrat/Min) pro mg Protein angegeben. Protein wurde nach Lowry et al. (17) mit Labtrol als Standard bestimmt, freigesetzte Aminosäuren mit Ninhydrin im TCA-Überstand (5%ig an TCA) anhand einer Eichkurve mit Leucin (21).

Inaktivierungsansätze (6)

Die Inaktivierungsansätze enthielten in einem Volumen von 3 ml 15 mg mikrosomales Protein und 1,5 mg lysosomales Protein ("lysosomale Inaktivierung"), die Kontrollansätze enthielten nur 15 mg mikrosomales Protein ("Autinaktivierung" der mikrosomalen Proteine durch die in der Fraktion vorhandenen lysosomalen Enzyme). Diese Ansätze wurden bei 37° C unter Stickstoff zur Verhinderung der Lipidperoxidation bei fortwährendem leichten Schütteln inkubiert. Bakterienwachstum hemmte ich durch Zugabe von Streptomycin und Penicillin in einer Konzentration von jeweils 100μg pro ml Ansatz. Alle zwei Stunden wurde dieses Antibiotikagemisch in einem Volumen von 0,01 ml erneut zugesetzt. Nach jeder Entnahme wurde die Stickstoffphase erneuert. Als Inkubationspuffer verwendete ich für p_H 5,0 0,15 M Citratpuffer, für p_H 7,0 0,25 M Tris/HCl-Puffer. Zu gegebenen Zeiten wurden 0,5 ml-Proben entnommen und durch Zugabe von 2ml eiskaltem 0,25 M Tris/HCl-Puffer p_H 7,5 gestoppt. Bei Bedarf wurden weitere Verdünnungen in demselben Puffer angefertigt. Die Messung der Proben erfolgte sofort anschließend.

Solubilisierungsversuche (23)

Inkubationsansätze wie oben wurden nach 40minütiger Inkubation bei p_H 5,0 durch 3fache Verdünnung in eiskaltem 0,25 M Tris/HCl-Puffer p_H 7,5 gestoppt und nach vorsichtiger Stickstoffsättigung 1 Std bei 150 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt für die Bestimmung der Enzymaktivitäten und Differenzspektren verwendet, das Sediment zur Bestimmung in einem definierten Volumen 0,25 M Tris/HCl-Puffer p_H 7,5 resuspendiert.

E R G E B N I S S E

Eigenschaften der verwendeten Fraktionen

Das als Ausgangsmaterial verwendete Leberhomogenat zeigte folgende spezifische Aktivitäten: 0,034 U/mg Protein saure Phosphatase, 0,58 U/mg Protein ß-Glucuronidase, 0,10 U/mg Protein Katalase, 175 U/mg Protein Succinatdehydrogenase. Der Proteingehalt der Leber betrug im Mittel 160 mg/g Feuchtgewicht.

Beim Vergleich meiner Lysosomenfraktion (Tab. 1a) mit den Ergebnissen von Leighton et al. (15) konnte ich feststellen, daß meine Ausbeute an Protein, lysosomaler saurer Phosphatase, mikrosomaler Glucose-6-phosphatase und peroxisomaler Katalase innerhalb der angegebenen Fehlergrenzen lag oder dieselben nur geringfügig überschritt. Für ß-Glucuronidase - ebenfalls ein spezifisch lysosomales Enzym - waren keine Vergleichswerte vorhanden, die Ausbeute an Succinatdehydrogenase entsprach der angegebenen an Cytochromoxidase (beides mitochondriale Leitenzyme). Zur Abschätzung der Anreicherung wurde nach Leighton et al. (15) die relative spezifische Aktivität (RSA) angegeben, die als der Quotient aus enzymatischer Aktivität in der Fraktion und Proteingehalt der Fraktion definiert ist, wobei beides in Prozent der Ausgangswerte im Leberhomogenat angegeben wird:

$$RSA = \frac{\text{Prozent enzymatische Aktivität}}{\text{Prozent Protein der Fraktion}}$$

Tabelle 1a

Verteilung der Leitenzyme und des Proteins in der aus Leberhomogenat isolierten Lysosomenfraktion. Angabe der in der Lysosomenfraktion enthaltenen enzymatischen Aktivität und des Proteins in Prozent des Gehaltes im Leberhomogenat sowie die daraus errechnete relative spezifische Aktivität (RSA).

	Ausbeute in Prozent des Leberhomogenats		RSA	
Protein	0.2	0.54 ± 0.29^{x}	1.0	1.0^{x}
Saure Phosphatase	11.0	19.7 ± 6.0^{x}	55.0	39.1 ± 9.3^{x}
Glucose-6-Phosphatase	0.6	0.37 ± 0.42^{x}	3.0	0.85 ± 1.0^{x}
Katalase	0.07	0.02 ± 0.03^{x}	0.35	0.05 ± 0.08^{x}
Succinatdehydrogenase	0.02	0.08 ± 0.08^{x}	0.10	0.07 ± 0.14^{x}
ß-Glucuronidase	2.6		13.0	

[x] Werte aus (15), die Werte für Succinatdehydrogenase sind bei (15) Cytochromoxidase-Werte.

Hohe Werte an RSA zeigen eine hohe Anreicherung über den Ausgangswert 1.0 des Homogenats an, niedrige eine geringe Verunreinigung mit dem entsprechenden Marker-

enzym. Die relativen spezifischen Aktivitäten der sauren Phosphatase lagen etwas über den Literaturwerten, während die Glucose-6-phosphatase in meiner Lysosomenfraktion eine 3fache höhere relative spezifische Aktivität aufwies und damit eine höhere mikrosomale Verunreinigung, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß die gerade in lysosomalen Fraktionen stattfindende hohe Hydrolyse des Glucose-6-phosphats durch saure Phosphatase nicht abgeschätzt werden konnte und daher keine Korrektur wie bei (15) durchgeführt wurde. Die relative spezifische Katalaseaktivität und damit die peroxisomale Verunreinigung konnte ich nicht soweit senken wie Leighton et al. (15). Sie war 7fach so hoch. Die relative spezifische Aktivität der Succinatdehydrogenase lag innerhalb der Schwankungsbreite der Werte für die Cytochomoxidase, d.h. die mitochondriale Verunreinigung war etwa ebenso groß. Insgesamt konnte ich die Reinheit der in der Literatur angegebenen Präparation (15) nicht ganz erreichen, was vor allem daran liegt, daß mir kein Durchflußrotor, wie ihn Leighton et al. verwendeten, zur Verfügung stand, so daß die Gradientenzentrifugation im Swing-out-Rotor durchgeführt werden mußte.

Von Herrn Dr. Schlote (Inst. f. Hirnforschung, Tübingen) freundlicherweise angefertigte elektronenmikroskopische Aufnahmen der sedimentierten, Triton-gefüllten Lysosomen zeigten geschwollene Vesikel, an deren Innenwand Überbleibsel der Matrix hafteten. Weiter waren viele kleine Vesikel und Membranbruchstücke zu sehen. Das Bild entsprach damit dem von Leighton et al. (15) veröffentlichten.

Zur Mikrosomenisolierung verwendete ich die institutsübliche Methode. Nach M. Gratzl (13, vgl. Tab. 1b) zeigten die relativen spezifischen Aktivitäten der Markerenzyme in der nach derselben Methode (Differentialzen-

Tabelle 1b

Verteilung der Leitenzyme und des Proteins in der aus Leberhomogenat isolierten Mikrosomenfraktion nach M. Gratzl (13). Angaben wie in Tabelle 1a.

	Ausbeute in Prozent des Leberhomogenats	RSA
Protein	5.6	1.0
Saure Phosphatase	4.1	0.73
Glucose-6-Phosphatase	11.5	2.1
Katalase	1.0	0.18
Succinatdehydrogenase	0.04	0.01
ß-Glucuronidase	23.8	4.3

Alle Werte nach M. Gratzl (13).

trifugation) isolierten Mikrosomenfraktion, daß diese zwar gut von Mitochondrien, jedoch weniger gut von Peroxisomen und Lysosomen gereinigt war. Eine durch diese Verunreinigung bedingte endogene Autolyse wurde durch Messung der "Autinaktivierung" in den Kontrollansätzen berücksichtigt. Die relativ niedrige Proteinausbeute ist durch großzügige Verwerfung des unteren Sedimentanteils vor dem Waschvorgang bedingt.

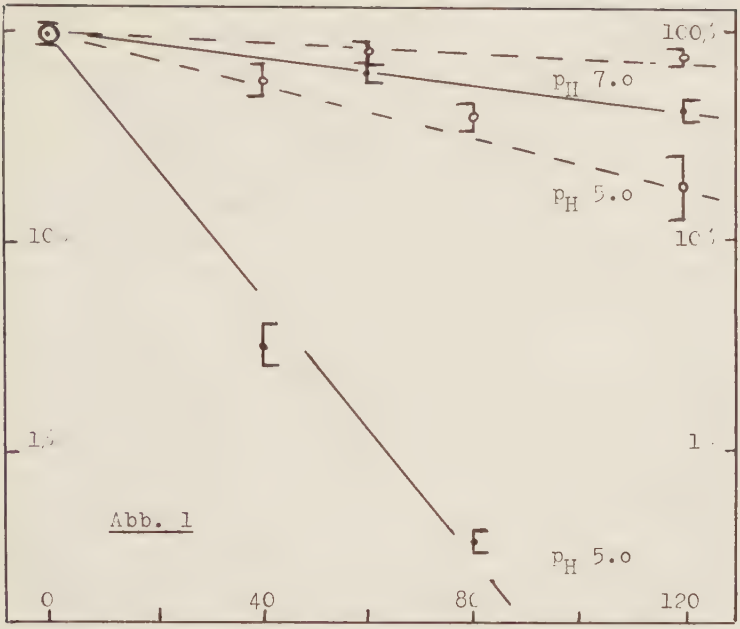

Abb. 1

Abb. 1: Inaktivierung der NADH-Cytochrom c-Reduktase: die Ausgangsaktivität (100% bei t = 0 Min) entsprach im Mittel 2,85 U/ml NADH-Cytochrom c-Reduktase.

•——• Ansätze mit 5 mg/ml mikrosomalem Protein und 0,5 mg/ml lysosomalem Protein

o- - -o Kontrollansätze mit 5 mg/ml mikrosomalem Protein

Darstellung in halblogarithmischem Maßstab: Abszisse= Zeit in Minuten, Ordinate = Prozent der noch vorhandenen Aktivität. Die Punkte entsprechen Mittelwerten aus fünf Inaktivierungsversuchen. Die Standardabweichung ist durch] bzw. [dargestellt.

Inaktivierungsversuche

Bei der Untersuchung der Inaktivierung der beiden membrangebundenen mikrosomalen Reduktasen durch Lysosomen-

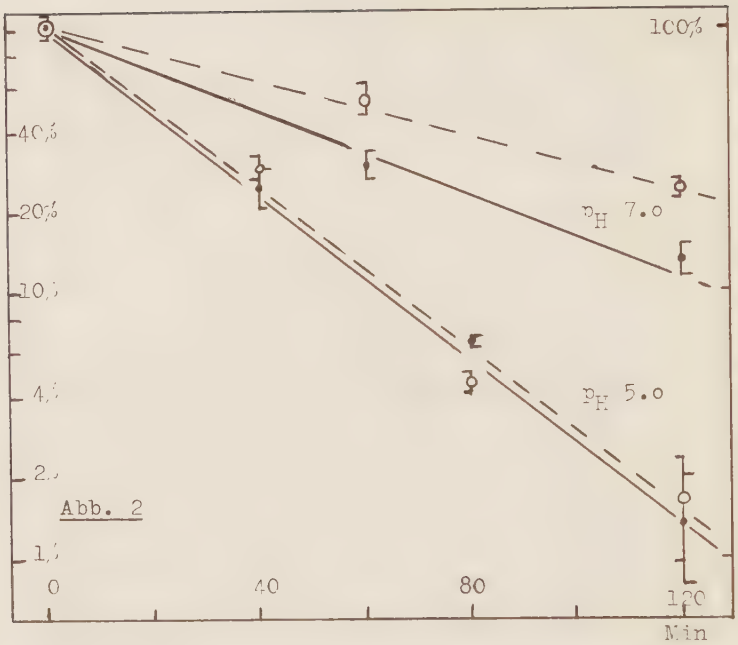

Abb. 2: Inaktivierung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase: die Ausgangsaktivität (100% bei t = 0 Min) entsprach im Mittel 0,12 U/ml NADPH-Cytochrom c-Reduktase. Legende wie Abb. 1.

fraktionen aus Triton WR 1339 - vorbehandelten Ratten erhielt ich folgende Ergebnisse:
In Mikrosomen sank die Aktivität der NADH-Cytochrom c-Reduktase nach zweistündiger Inkubation bei p_H 5,0 auf 22% der ursprünglich vorhandenen ab. Der Zusatz von lysosomalem Protein bewirkte unter diesen Bedingungen eine sehr große Beschleunigung der Inaktivierung: bereits nach 70 Min war die Ausgangsaktivität auf etwa 1/2% abgesunken. Bei p_H 7,0 war die Autinaktivierung des Enzyms in Mikrosomen bei weitem nicht so stark wie bei p_H 5,0 (nach 2 Std noch 75% der Ausgangsaktivität).

Lysosomen steigerten unter diesen Bedingungen die Inaktivierungsgeschwindigkeit auf über das Doppelte. Vergleiche hierzu Abb. 1.
Die "Autinaktivierung" der NADPH-Cytochrom c-Reduktase bei p_H 7,0 erfolgte erheblich rascher als die der NADH-Cytochrom c-Reduktase (nach 2 Std noch 26% der Ausgangsaktivität). Bei Lysosomenzusatz konnte ich nach 2 Std nur noch 11% nachweisen. Bei p_H 5,0 war die Inaktivierung stark erhöht (1,4% der Ausgangsaktivität nach 2 Std), Lysosomen erhöhten die Inaktivierung nicht. Vgl. hierzu Abb. 2.
Um festzustellen, ob lösliche neutrale Proteasen an der Inaktivierung der untersuchten Enzyme beteiligt sind, führte ich Inaktivierungsversuche mit 100 000 g-Überstand als Enzymquelle bei p_H 7,0 durch. Für p_H 8,0 wurde bereits Proteasenaktivität im zytoplasmatischen Überstand nachgewiesen (6), doch dürfte dieser p_H im Zellplasma wohl kaum erreicht werden. Um meine Mikrosomenfraktion noch weitgehender von lysosomaler Verunreinigung zu befreien (vgl. Aminosäurefreisetzung in Abb. 3), isolierte ich für diese Versuche nur die leichten Anteile des endoplasmatischen Retikulums, nämlich die glatten mikrosomalen Membranen. Der 100 000 g-Überstand wurde im gleichen Verhältnis wie im Homogenat den Membranen zugesetzt (in einem Volumen von 3ml 4,2 mg glattes mikrosomales Protein in den Kontrollansätzen, zusätzlich 5,4 mg lösliches Protein des 100 000 g-Überstandes in den Versuchsansätzen). Dabei ergab sich für die NADH-Cytochrom c-Reduktase eine nur geringe Beschleunigung der Inaktivierung durch Zugabe des cytoplasmatischen Überstandes. Die Autinaktivierung dieses Enzyms in den gereinigten mikrosomalen Membranen verlief langsamer als in den Mikrosomenpräparationen. Die NADPH-Cytochrom c-Reduktase wurde durch Zusatz des 100 000 g-Überstandes anscheinend stabilisiert, was auf einer unspezifi-

Tabelle 2

Inaktivierung mikrosomaler Reduktasen durch Zusatz von Lysosomen und 100 000 g-Überstand: Angabe der nach 90minütiger Inkubation bei 37° C noch vorhandenen Enzymaktivität in Prozent (die Werte sind aus den Abfallkurven im halblogarithmischen Maßstab entnommen). Der Ausgangsaktivität entsprachen im Mittel 2,85 U/ml NADH-Cytochrom c-Reduktase und 0,12 U/ml NADPH-Cytochrom c-Reduktase.

Fraktionen im Ansatz	p_H	NADH-Cytochrom c-Reduktase	NADPH-Cytochrom c-Red.
Mikrosomen	5.0	32	4.1
Mikrosomen + Lysosomen	5.0	0.12	4.1
Mikrosomen	7.0	80	36
Mikrosomen + Lysosomen	7.0	55	20
glatte Mikrosomen	7.0	90	34
glatte Mikrosomen + 100000g-Überstand	7.0	84	50

schen Stabilisierung des Enzyms durch Bestandteile des cytoplasmatischen Überstandes oder einer Aktivierung, möglicherweise durch Solubilisierung, beruhen kann.

Aminosäurefreisetzung in den Inkubationsansätzen

Die Aminosäurefreisetzung wurde mit Ninhydrin bestimmt und als Parameter für die erfolgte Proteolyse bewertet. Bei p_H 7,0 wurde die Aminosäurefreisetzung aus Mikro-

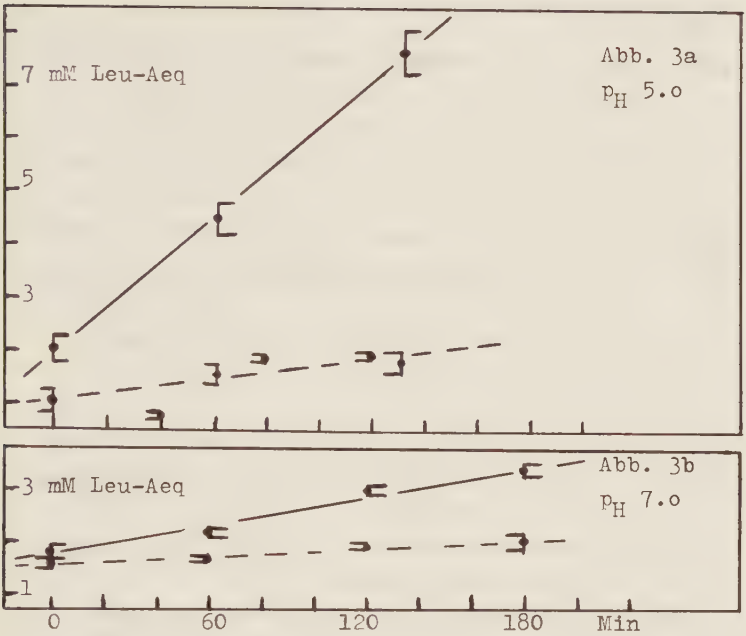

Abb. 3a und 3b: Freisetzung von Aminosäuren (gemessen als Leucinäquivalente)
3a) Inkubation bei p_H 5.0 und 3b) Inkubation bei p_H 7.0:
[——[Ansätze mit 5 mg/ml mikrosomalem und 0.5 mg/ml lysosomalem Protein
]- - -[Kontrollansätze mit 5 mg/ml mikrosomalem Protein
Die Punkte entsprechen Mittelwerten aus vier Ansätzen.

somen durch Lysosomenzusatz etwas gesteigert, die Autolyse der Mikrosomenfraktion war klein (vgl. Abb. 3b). Bei p_H 5.0 war die Autolyse kaum stärker, ein Zusatz von Lysosomen bewirkte jedoch eine erhebliche Proteolyse (vgl. Abb. 3a).

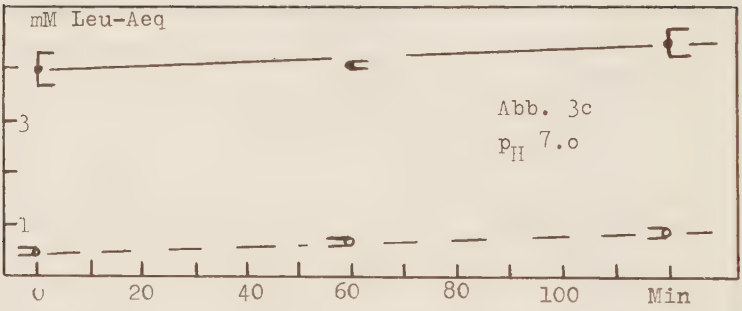

Abb. 3c: Freisetzung von Aminosäuren (gemessen als Leucinäquivalente)
Inkubation bei p_H 7.0
{——{ Ansätze mit glatten Mikrosomen (1.4 mg/ml Protein) und 100 000 g-Überstand (1.8 mg/ml Protein)
}- - -} Kontrollansätze mit glatten Mikrosomen (1.4 mg/ml Protein)
Die Punkte entsprechen Mittelwerten aus vier Ansätzen.

100 000 g-Überstand erhöhte die geringe Autolyse glatter mikrosomaler Membranen bei p_H 7.0 überhaupt nicht (vgl. Abb. 3c).

Solubilisierung der mikrosomalen Membran-gebundenen Cytochrom c-Reduktase durch Lysosomen bei p_H 5.0

Nach 40minütiger Inkubation von Mikrosomen bei p_H 5.0 konnte ich keine Cytochrom c-Reduktase-Aktivität im Überstand finden. Bei Zusatz von Lysosomen waren unter gleichen Bedingungen 14% der NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität und 1.5% der NADH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität im Überstand gelöst. Nach Takesue und Omura (23) wird bei p_H 5.7 unter allerdings weit höherer Lysosomenkonzentration die NADH-Cytochrom c-Reduktase nahezu vollständig solubilisiert, doch fällt unterhalb

p_H 5.7 die Aktivität infolge Inaktivierung des Enzyms rapide ab. Es ist also anzunehmen, daß auch unter meinen Versuchsbedingungen eine hohe Solubilisierung der Reduktase stattfand, das gelöste Enzym jedoch recht rasch inaktiviert wurde. Die Werte für die NADPH-Cytochrom c-Reduktase sind trotz der veränderten Versuchsbedingungen durchaus vergleichbar: Omura und Takesue (23) fanden 20% solubilisiertes Enzym.

Diskussion

Aus den vorstehenden Versuchsergebnissen erhellt, daß die untersuchten mikrosomalen Reduktasen unter verschiedenen Bedingungen recht unterschiedliches Verhalten gegenüber dem Angriff lysosomaler Enzyme zeigen:
Bei p_H 7.0 fand sich parallel zu einer nur geringfügigen Erhöhung der Aminosäurefreisetzung aus Mikrosomen durch Zusatz lysosomaler Präparationen eine Beschleunigung der Inaktivierung der beiden Reduktasen auf etwa das Doppelte, d. h. ich konnte unter diesen Bedingungen keinen Unterschied zwischen den beiden Enzymen feststellen. In Einklang damit ist die proteolytische Aktivität der lysosomalen Enzyme unter diesen Bedingungen gering. Bei p_H 5.0 dagegen änderte sich das Bild erheblich: gemeinsam mit einer starken Erhöhung der Aminosäurefreisetzung aus Mikrosomen durch Zusatz lysosomaler Enzyme, d. h. unter den Bedingungen einer effizienten Proteolyse, zeigte sich eine unterschiedliche Inaktivierungsbeschleunigung der Enzyme gegenüber den Kontrollansätzen. Die Inaktivierung der NADH-Cytochrom c-Reduktase wurde um weit über das Zehnfache beschleunigt, die der NADPH-Cytochrom c-Reduktase überhaupt nicht, was auf eine spezifische Wirkung der lysosomalen Enzyme auf die NADH-Cytochrom c-Reduktase schliessen läßt.
Die Beteiligung löslicher cytoplasmatischer Enzyme an der Inaktivierung der beiden mikrosomalen Reduktasen erscheint auf Grund der Inkubationsversuche mit glatten endoplasmatischen Membranen und 100 000 g-Überstand recht unwahrscheinlich. Es konnte weder eine wesentliche Änderung der Enzyminaktivierung noch eine Änderung der Aminosäurefreisetzung festgestellt werden.
Da die verschiedenen Inaktivierungsraten der einzelnen membrangebundenen Proteine entweder durch Solubilisierung und nachfolgende erleichterte Denaturierung des

gelösten Proteins in saurem Milieu oder durch proteolytische Prozesse bedingt sein können, führte ich Solubilisierungsexperimente durch. Grundsätzlich ist jedoch zu berücksichtigen, daß Solubilisierung und Proteolyse durchaus von demselben hydrolytischen System bewirkt werden könnten, wodurch eine experimentelle Unterscheidung sehr erschwert wird.
Die NADPH-Cytochrom c-Reduktase wurde zwar solubilisiert, aber nicht beschleunigt inaktiviert, d.h. dieses Enzym war in gelöster Form unter unseren Versuchsbedingungen ähnlich stabil wie in membrangebundener.
Die NADH-Cytochrom c-Reduktase wurde sowohl solubilisiert als auch beschleunigt inaktiviert, wobei noch zu berücksichtigen ist, daß die Solubilisierungswerte für die NADH-Cytochrom c-Reduktase erheblich höher liegen dürften als die von mir gemessenen, da nach Omura et al. (23) die Reduktase bei Solubilisierung durch Lysosomen unterhalb p_H 5.5 sehr rasch inaktiviert wird.
Für die NADH-Cytochrom c-Reduktase scheint es damit durchaus denkbar, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der beschleunigten Inaktivierung durch lysosomale Enzyme die Solubilisierung von der Membran darstellt. Die gelöste Form des Enzyms sollte dann einer sehr raschen sauren Denaturierung mit anschliessender Proteolyse unterworfen werden. Allerdings können direkte Inaktivierungsprozesse am membrangebundenen Enzym keinesfalls ausgeschlossen werden.
In ähnlichen Versuchen konnte M. Gratzl (13) zeigen, daß die mikrosomalen Cytochrome b_5 und P 450 bei p_H 5.0 von lysosomalen Enzymen unterschiedlich inaktiviert werden, und zwar wird das fest in der Membran gebundene Cytochrom P 450 von lysosomalen Enzymen nicht angegriffen, während die Inaktivierung des weniger fest an die Membran gehefteten Cytochroms b_5 bei p_H 5.0 durch Lysosomen erheblich beschleunigt wird. Beim Vergleich

mit den eigenen Ergebnissen zeigt sich also eine Korrelation zwischen funktioneller Zusammengehörigkeit der Enzyme und der Angreifbarkeit durch lysosomale Enzyme: die zusammengehörenden Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom c-Reduktase werden beschleunigt inaktiviert, Cytochrom P 450 und die entsprechende NADPH-Cytochrom c-Reduktase werden nicht angegriffen. Inwieweit die gleichsinnige starke Inaktivierung der Enzyme des einen mikrosomalen Elektronentransportsystems - NADH-Cytochrom c-Reduktase und Cytochrom b_5 - im Vergleich zu der schwachen Inaktivierung der Proteine der mischfunktionellen Hydroxylierungskette durch lysosomale Enzym bei p_H 5.0 in vivo eine Rolle spielt, bleibt zu untersuchen. Leider läßt sich jedoch keine Übereinstimmung zwischen den Halbwertszeiten der einzelnen mikrosomalen Proteine, die nach (4,12,14,18,20) durch Einbau radioaktiver Vorstufen bestimmt wurde, feststellen, sondern es zeigt sich das kurzlebige Cytochrom P 450 resistent gegenüber dem Angriff lysosomaler Enzyme im Gegensatz zum längerlebigen Cytochrom b_5 (13), und ebenso wird nur die NADH-Cytochrom c-Reduktase, deren Halbwertszeit nicht bekannt ist, angegriffen, nicht aber die mit etwa der Halbwertszeit des gesamten endoplasmatischen Retikulums umgesetzte NADPH-Cytochrom c-Reduktase. Somit erscheint unwahrscheinlich, daß die Lysosomen unmittelbar an der Regulation der Halbwertszeiten der einzelnen Membranbestandteile beteiligt sind.

Andererseits lassen sich keine Anhaltspunkte für die an sich bestechende und einleuchtende Hypothese finden, daß die Halbwertszeit der einzelnen Proteine in der Struktur derselben selbst verankert sei. Dann nämlich sollte die Stabilität der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur - die Konformation des Proteins also - allein die Turnoverrate eines Proteins bestimmen, indem nur die Höhe der Aktivierungsenergie für den Übergang in den

ungeordneten denaturierten Zustand des random coil entscheidet, ob ein Protein schnell oder langsam inaktiviert wird. Der Abbau inaktivierter Membranstücke könnte dann durchaus - jedoch ganz unselektiv - von den Lysosomen übernommen werden. Durch die Ersparnis spezifischer Mechanismen wäre eine solche Regulation des Abbaus auf der Ebene des Substratmoleküls selbst die ökonomischste Lösung überhaupt. Doch sollte man bei der Gültigkeit einer derartigen Molekül-immanenten Regulation unter den Bedingungen des Cytosols, also etwa bei p_H 7.0, bei der Autinaktivierung von Mikrosomen wenigstens angenähert dieselben Verhältnisse bei der Inaktivierung der mikrosomalen Proteine finden wie bei den durch Einbau bestimmten Halbwertszeiten. Dies läßt sich jedoch aus den Daten von M. Gratzl (13) sowie meinen eigenen Ergebnissen nicht bestätigen. Daher bleibt weiter die Frage nach dem Mechanismus der Regulation des Proteinturnovers offen.

Literaturverzeichnis

1) Aronson, N.N., De Duve, C:
Digestive Activity of Lysosomes II
J. Biol. Chem. 243, 4564 - 4573 (1968)

2) Arrigoni, O., Singer, T.P:
Limitations of the Phenazine Methosulphate Assay for Succinic and related Dehydrogenases
Nature 193, 1256 -1267 (1962)

3) Bergmeyer, H.U:
Zur Messung von Katalase-Aktivitäten
Biochem. Z. 327, 255 - 258 (1955)

4) Betz, H:
Halbwertszeiten mikrosomalen Proteins, gereinigter NADPH-abhängiger Cytochrom c-Reduktase sowie gereinigten Cytochroms b_5 und deren Bedeutung für die Biogenese des endoplasmatischen Retikulums
Diplomarbeit Tübingen (1969)

5) Bohley, P:
Intrazelluläre Proteolyse
Naturwissenschaften 55, 211 - 217 (1968)

6) Coffey, J.W., De Duve, C:
Digestive Activity of Lysosomes I
J. Biol. Chem. 243, 3255 -3263 (1968)

7) Daems, T.W., Wisse, E., Brederoo, P:
Elektron mikroscopy of the vacuolar apparatus
in: Lysosomes in Biology and Pathology 1, 64 - 112 (1969), 1. Aufl. North-Holland Publishing Company, Amsterdam - London

8) Ericsson, J.L.E:
Mechanism of cellular autophagy

Lysosomes in Biology and Pathology 2, 345 - 394, (1969), 1. Aufl. North-Holland publishing Company, Amsterdam - London

9) Fouts, J.R:
The Metabolism of Drugs by Subfractionations of Hepatic Microsomes
Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 373 - 378 (1961)

10) Fowler, S., De Duve, C:
Digestive Activity of Lysosomes III
J. Biol. Chem. 244, 471 -481 (1969)

11) Gianetto, R., De Duve C:
Tissue Fractionation Studies
Biochem. J. 59, 433 - 438 (1955)

12) Gratzl, M:
Halbwertszeiten mikrosomalen Proteins, sowie gereinigten Cytochroms P 420 und deren Bedeutung für die Biogenese des endoplasmatischen Retikulums
Diplomarbeit Tübingen (1969)

13) Gratzl, M:
Inaktivierung mikrosomaler Cytochrome durch lysosomale Enzyme
Dissertation Tübingen (1971)

14) Kuriyama, Y., Omura, T., Siekevitz, P., Palade, G.E:
Effects of Phenobarbital on the Synthesis and Degradation of the Protein Components of Rat Liver Microsomal Membranes
J. Biol. Chem. 244, 2017 -2026 (1969)

15) Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J.W., Fowler, S., De Duve, C:
The Large-Scale Separation of Peroxisomes, Mitochondria and Lysosomes from the Livers of Rats injected

with Triton WR-1339
J. Cell. Biol. 37, 482 - 513 (1968)

16) Leloir, L.F., Cardini, C.E:
Characterisation of Phosphorus Compounds by Acid Lability
Methods in Enzymology III, 840 - 844 (1957), 1. Aufl.
Academic Press New York

17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J:
Protein Measurement with the Folinphenol Reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

18) Omura, T., Siekevitz, P., Palade, G.E:
Turnover of Constituents of the Endoplasmic Reticulum Membranes of Rat Hepatocytes
J. Biol. Chem. 242, 2389 - 2396 (1967)

19) Schenkmann, J.B., Remmer, H., Estabrook, R.W:
Spectral Studies of Drug Interaction with Hepatic Microsomal Cytochrome
Mol. Pharmacol. 3, 113 - 123 (1967)

20) Schimke, R.T., Ganschow, R., Doyle, D., Arias, I.M:
Regulation of Protein Turnover in Mammalian Tissues
Federation Proceedings 27, 1223 - 1229 (1968)

21) Spies, J.R:
Ninhydrin Method
Methods in Enzymology III, 468 - 471 (1957),
1. Aufl. Academic Press New York

22) Strittmatter, P., Velick, S.F:
A Microsomal Cytochrome Reductase specific for Diphosphopyridine Nucleotide
J. Biol. Chem. 221, 277 - 286 (1956)

23) Takesue, S., Omura, T:
Solubilisation of NADH-Cytochrom b_5-Reduktase of Liver Microsomes by Lysosomal Digestion
J. of Biochemistry 67, 259 - 272 (1970)

24) Williams, C.H., Kamin, H:
Microsomal Triphosphopyridine Nucleotide - Cytochrome c-Reduktase of Liver
J. Biol. Chem. 237, 587 - 595 (1962)

Lebenslauf

Am 20. September 1944 wurde ich, Heinrich Betz, in Reutlingen als Sohn des Dr. med. Konrad Betz und seiner Ehefrau Dr. med. Meinholde, geb. Oesterreich, geboren. Nach dem Besuch des altsprachlichen Gymnasiums legte ich im März 1963 in Schwäbisch Hall die Reifeprüfung ab. Ab Sommersemester 1963 studierte ich in Tübingen Biochemie und Medizin, 1967/68 in München, anschließend wieder in Tübingen. 1969 legte ich die Diplomprüfung für Biochemiker ab, im Juli 1971 das medizinische Staatsexamen.